

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-281797

(49)公開日 平成4年(1992)10月7日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 21/08		8214-4B		
C 12 N 5/16				
// C 12 N 15/07				
		7236-4B	C 12 N 5/00	B
		8828-4B	15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平3-69271

(22)出願日 平成3年(1991)3月8日

(71)出願人 000006116
森永製菓株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 望月 克巳
神奈川県横浜市神奈川区三ツ沢中町23番33号

(72)発明者 佐藤 進
神奈川県横浜市瀬谷区相沢4丁目20番12号

(72)発明者 橋爪 旁一
神奈川県横浜市金沢区並木3丁目7番4-1303号

(74)代理人 弁理士 松井 茂

(54)【発明の名称】モノクローナル抗体生産用培地の作製法及びそのキット

(57)【要約】

【目的】モノクローナル抗体の生産を増強させることができる培地の作製方法及びそれに用いる培地作製キットを提供する。

【構成】糖質及びグルタミンを含有しない培地に、糖質とグルタミンを種々の濃度で添加して培地を作製し、それぞれの培地を用いて抗体生産細胞を培養することにより、モノクローナル抗体生産が最も増強される糖質濃度及びグルタミン濃度を設定する。糖質及びグルタミンを含有しない培地と、糖質と、グルタミンとからなるキットを用いれば、糖質濃度及びグルタミン濃度を種々変化させた培地を容易に作製できる。糖質としては、特に果糖が好ましく用いられる。

(2)

特開平4-281797

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体を生産する抗体生産細胞を培養する培地の作製法において、糖質及びグルタミンを含有しない培地組成に、糖質及びグルタミンを種々の濃度で添加して、糖質及びグルタミンの含有量が異なる複数の培地を作製し、それぞれの培地を用いて抗体生産細胞を培養し、モノクローナル抗体生産が増強される糖質濃度及びグルタミン濃度を求める特徴とするモノクローナル抗体生産用培地の作製法。

【請求項2】 前記糖質として果糖を用いる請求項1記載のモノクローナル抗体生産用培地の作製法。

【請求項3】 糖質及びグルタミンを含有しない培地を備えていることを特徴とするモノクローナル抗体生産用培地作製キット。

【請求項4】 糖質及びグルタミンを含有しない培地と、糖質と、グルタミンとを組合せた請求項3記載のモノクローナル抗体生産用培地作製キット。

【請求項5】 前記糖質が果糖である請求項4記載のモノクローナル抗体生産用培地作製キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗体生産細胞によるモノクローナル抗体生産を増強させる培地の作製法及びそのキットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、抗体生産細胞を培養してモノクローナル抗体を生産する場合には、培地成分として、ブドウ糖、アミノ酸、ビタミン、ヌクレオチド前駆体、脂肪酸又は脂肪酸エステル、ポリアミン、ヒルビン酸ナトリウム、無機塩等を含有する市販の動物細胞用合成培地を1種類或いは数種類混合したものを基礎培地とし、これに成長因子として牛胎児血清或いは他の細胞増殖因子等を添加したものが用いられていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記従来の培地では、モノクローナル抗体の生産量が少なく、工業的に十分な量を得ることが困難であった。特にヒトヒトハイブリドーマを用いてヒト型モノクローナル抗体を生産する場合には、生産量が極端に少なくその利用には限界があった。このような状況において、モノクローナル抗体の生産を増強させることができる培地の作製法の開発が強く望まれていた。

【0004】 本発明の目的は、モノクローナル抗体の生産を増強させることができる培地の作製方法及びそれに用いる培地作製キットを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、モノクローナル抗体の生産を上昇させる培地の作製法について鋭意研究した結果、培地中における糖質及びグルタミンの濃度を適度に調節することによって、モノクローナル抗

10

20

30

40

50

2

体の生産を増強できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 本発明のモノクローナル抗体生産用培地の作製法は、糖質及びグルタミンを含有しない培地組成に、糖質及びグルタミンを種々の濃度で添加して、糖質及びグルタミンの含有量が異なる複数の培地を作製し、それぞれの培地を用いて抗体生産細胞を培養し、モノクローナル抗体生産が増強される糖質濃度及びグルタミン濃度を求める特徴とする。

【0007】 本発明のモノクローナル抗体生産用培地作製キットは、糖質及びグルタミンを含有しない培地を備えていることを特徴とする。

【0008】 本発明の好ましい態様において、上記モノクローナル抗体生産用培地作製キットは、糖質及びグルタミンを含有しない培地と、糖質と、グルタミンとを組合せたものからなる。

【0009】 本発明の更に好ましい態様においては、前記糖質として果糖が使用される。

【0010】 以下、本発明について更に詳細に説明する。

①抗体生産細胞

抗体生産細胞としては、ヒトヒトハイブリドーマ、マウスマウスハイブリドーマ、ヒトマウスハイブリドーマ、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr Virus, EBV) で形質転換した細胞等が利用できる。本発明は、特にヒトヒトハイブリドーマに有効である。

【0011】 の糖質及びグルタミンの含有量を種々組み合わせた培地糖質としてはブドウ糖、果糖、ガラクトース、マンノースが利用でき、特に果糖が有用である。これらの糖質はただ1種類のみを選んでもよいし、複数を組み合わせて用いてもよい。

【0012】 培地の作製法としては、基本合成培地として知られている RDP 培地 (RPNI 1640 培地、DME 培地及びハム F-12 培地を 2:1:1 の割合で混合した培地) の含有成分のうち、糖質であるブドウ糖及びグルタミンを含有しない培地を調製し、これに新たに糖質及びグルタミンを添加する方法が例示できるが、基本合成培地としてはダルベッコ MEM 培地 (DMEM)、ハム F-12 培地、E-RDF 培地 (極東製薬工業株式会社より販売) 等の含有成分も利用することができる。

【0013】 上記の基本培地に添加する糖質及びグルタミンの量は、実際上可能な範囲内において任意に設定できるが、糖質については 0.5 ~ 4.5 g/L、グルタミンについては 0 ~ 1,000 mg/L の範囲で設定することが好ましい。

【0014】 また、本発明に用いる培地は、血清を添加しない無血清培地でもよく、血清培地であってもよい。血清培地としては、例えば 10% 牛胎児血清を添加した培地が挙げられるが、モノクローナル抗体生産用培地としては、抗体の精製が容易であること、培地が安価である

(3)

特開平4-281797

9

こと等の理由から無血清培地を用いるのが望ましい。無血清培地への添加物としては、血清アルブミン、インシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム等が挙げられる。

【0015】③培養法

抗体生産細胞の培養には、例えばペトリ皿、スピンナーフラスコ、灌流型連続培養装置、又はホローファイバー型の培養装置が利用でき、例えばペトリ皿を用いた場合には、5%CO₂ - 95%空気の雰囲気下で、37°Cにて数日間培養すればよい。

【0016】培養終了後、培養液上清中の抗体濃度を、例えば通常の酵素抗体法（イムノケミストリー（Immunochemistry）、8、871(1971)参照）で測定し、抗体生産量が最も多い培地の糖質濃度及びグルタミン濃度を求める。そして、この濃度になるように糖質及びグルタミンを添加して培地を作製すれば、モノクローナル抗体の生産を増強させることができる培地が得られる。

【0.017】④モノクローナル抗体生産用培地作製キット

本発明によるモノクローナル抗体生産用培地作製キットは、上述のモノクローナル抗体生産用培地の作製を容易に行なうためのものである。

【0018】すなわち、このキットは、(a) 糖質及びグルタミンを含有しない培地、(b) ブドウ糖、果糖、ガラクトース、マンノース等の糖質、(c) グルタミンから構成され、(a) に、(b) のうちの 1 種或いは数種、及び(c) を添加することのみで糖質及びグルタミンの含有量を種々組み合わせた培地を作製することができ、これで用いて抗体生産細胞を培養することによって、モノクローナル抗体生産を増強させる糖質濃度及びグルタミン濃度を決定することができる。

【0019】ただし、糖質、グルタミンは、一般に容易

4

に入手できるものなので、上記キットは、少なくとも糖質及びグルタミンを含有しない培地を備えたものであればよく、また、糖質は、特に有用な果糖だけであってもよい。なお、このキットの構成物は、水溶液、乾燥粉末等の各種の製品形態で提供することができる。

【0020】

【作用】本発明では、糖質濃度及びグルタミン濃度を種々変えた培地で、抗体生産細胞を培養し、培養液中の抗体量を測定することにより、抗体生産が最も増大する糖質濃度及びグルタミン濃度を求めることができる。そして、そのような濃度になるように糖質及びグルタミンを添加した培地を用いることにより、モノクローナル抗体の生産量を増大させることができる。

【0021】また、本発明の培地作製キットを用いれば、糖質及びグルタミンを含有しない培地に、糖質及びグルタミンを添加するだけで、糖質及びグルタミンの濃度が異なる複数種類の培地を容易に作製することができる。

【0022】

【実施例】実施例1

(1) 培地

糖質及びグルタミンを含有しない培地として、表1に示す組成の液状RDF培地を用い、これにグルタミンを最終濃度で174.5mg/L 及び349mg/L になるように添加した培地を作製し、更にこれらの培地それぞれに果糖を0.68、1.35、2.0、2.7g/Lとなるように添加した培地を調製して基礎培地とした。比較対照には、RDF培地（糖質としてブドウ糖2.7g/L及びグルタミン 349mg/Lを含有する）を用いた。また、上述の基礎培地それぞれに表2に記載したものを添加した。

【0023】

【表1】

(4)

特開平4-281797

5

6

変法 R D F 培地の組成 (単位: mg/L)

L-アラニン	2.3	塩化コリン	6.3
L-アルギニン	105	葉酸	1.9
L-アルギニン塩酸塩	77.4	イノシトール	25.0
L-アスパラギン(一水塩)	33.8	ニコチン酸アミド	1.6
L-アスパラギン酸	14.0	塩酸ピリドキサール	1.1
L-システィン塩酸塩(一水塩)	9.2	塩酸ピリドキシン	0.55
L-シスチン・二塩酸塩	50.3	リボフラビン	0.22
L-グルタミン酸	14.4	塩酸チアミン	1.7
グリシン	15.1	ビタミンB12	0.36
L-ヒスチジン	7.9	リボ酸	0.056
L-ヒスチジン塩酸塩(一水塩)	16.6	ヒポキサンチン	1.07
L-ヒドロキシプロリン	10.5	ブトレッサンニ塩酸塩	0.04
L-イソロイシン	54.8	チミジン	0.19
L-ロイシン	57.2	リノール酸メチル	0.024
L-リジン塩酸塩	69.0	塩化ナトリウム	6825
L-メチオニン	16.9	塩化カリウム	373.8
L-フェニルアラニン	26.6	塩化カルシウム(無水)	61.2
L-プロリン	19.5	硫酸マグネシウム(無水)	70.2
L-セリン	29.5	リン酸一水素ナトリウム(無水)	457.8
L-スレオニン	38.6	リン酸二水素ナトリウム(無水)	28.6
L-トリプトファン	7.4	ビルビン酸ナトリウム	57.8
L-チロシン	30.9	硫酸銅(五水塩)	0.0008
L-バリン	38.1	硫酸第一鉄(七水塩)	0.23
グルタチオン	0.53	硫酸亜鉛(七水塩)	0.23
バラアミノ安息香酸	0.53	硝酸第二鉄(九水塩)	0.026
ビオチン	0.11	硝酸カルシウム(四水塩)	52.5
バントテン酸カルシウム	1.25	フェノールレッド	6.9
		炭酸水素ナトリウム	2220

[0024]

[表2]

(5)

特開平4-281797

8

血清アルブミン	(ヒト)	2 mg/ml
インシュリン	(ウシ)	5 μ g/ml
トランスフェリン	(ヒト)	35 μ g/ml
エタノールアミン		20 μ M
亜セレン酸ナトリウム		2.5 nM

【0025】(2) 培養方法及び結果
 35mmペトリ皿に上記培地をそれぞれを注入し、これに抗体生産細胞としてIgM型のヒト型モノクローナル抗体を10⁶を表3に示す。
 生産するヒト-ヒトハイブリドーマ HB4C5(微小細胞寄
 第1879号)を、前記変法RDFで2回洗浄した後、8×
 10⁶細胞/mlになるように播種した。37℃の炭酸ガス*

*インキュベーター中で、7日間培養して培地中に生産された抗体濃度を通常の酵素抗体法で測定した。この結果

【0026】
 【表3】

グルタミン濃度 (mg/L)	果糖濃度 (g/L)	生細胞数 (×10 ⁶ 細胞/ml)	生存率 (%)	抗体濃度 (μ g/ml)
174.5	0.68	1.8	62	1.5
	1.35	3.3	87	4.9
	2.0	3.3	86	2.6
	2.7	2.7	86	0.56
	349	0.68	2.8	1.3
	1.35	5.0	93	3.8
	2.0	4.3	94	3.0
	2.7	3.9	84	0.48
比較対照 RDF培地		3.7	86	3.2

【0027】表3に示されるように、培地中のグルタミン濃度及び果糖濃度を変化させることにより、培地中に生産される抗体濃度が変化し、グルタミン濃度が174.5 mg/Lで、果糖濃度が1.35 g/Lのときに抗体生産量が最も増大し、比較対照のRDF培地に比べて生産量が1.5倍になることがわかる。

【0028】実施例2
 糖質及びグルタミンを含有しない培地として、前記変法RDF培地を用い、これにグルタミンを最終濃度で150mg/L、174.5mg/L、349mg/Lになるように添加した培地を作製し、更にそれぞれの培地に果糖を1.35 g/Lとなる※

※ように添加した培地を調整して基礎培地とした。比較対照には、RDF培地(糖質としてブドウ糖2.7g/L及びグルタミン 349mg/Lを含有する)を用いた。また、上述の基礎培地それぞれに表2に記載したものを添加した。

【0029】上記の培地をそれぞれ用いて、実施例1と同様にして、抗体生産細胞であるヒト-ヒトハイブリドーマ HB4C5を培養し、培地中に生産された抗体濃度を通常の酵素抗体法で測定した。この結果を表4に示す。

【0030】
 【表4】

グルタミン濃度 (mg/L)	果糖濃度 (g/L)	生細胞数 (×10 ⁶ 細胞/ml)	生存率 (%)	抗体濃度 (μ g/ml)
150	1.35	3.4	93	3.9
	174.5	3.8	78	5.5
	200	3.3	74	4.2
比較対照 RDF培地		3.7	85	3.9

【0031】表4に示されるように、培地中の果糖濃度 50 を1.35 g/Lにした場合、グルタミン濃度が174.5mg/Lの

(6)

特開平4-281797

9

ときに、抗体生産量が最も増大することがわかる。

【0032】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、糖質濃度及びグルタミン濃度を種々変えた培地で抗体生産細胞を培養することにより、抗体生産が最も増大する培地中の糖質濃度及びグルタミン濃度を求めることがで

10

る。こうして糖質濃度、グルタミン濃度を設定した培地を用いることにより、モノクローナル抗体の生産量を増大させることができる。また、本発明の培地作製用キットを用いることにより、糖質濃度及びグルタミン濃度を種々変えた培地を容易に作製することができ、上記の作業を能率的に行なうことができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

An abridged translation of Cited Document 2

Cited Document 2: JP-A Publication No. Hei 04-281797:

Column 1, lines 26-33:

[0002]

Background of the Invention: Conventionally, to produce a monoclonal antibody by culturing antibody producing cells, at least one commercially available synthetic culture medium for animal cells have been used as a basal medium, to which fetal bovine serum or another cell growth factor is added as growth factor. The basal medium contain, as components, glucose, amino acids, vitamins, nucleotide precursors, fatty acids or esters thereof, polyamines, sodium pyruvate, mineral salts, etc.

Column 2, line 19- column 3, line 4:

[0010]

Below are the detailed description of the present invention.

(1) Antibody producing cells

Cells such as human-human hybridomas, mouse-mouse hybridomas, human-mouse hybridomas, and cells transformed with Epstein-Barrvirus (EBV) may be used as antibody producing cells.

[0011]

(2) Glucose, fructose, galactose and mannose may be used as sugar sources for culture media in which sugar and glutamine contents are variously combined, and fructose is particularly useful among them. These carbohydrates may be used as a single component or in combination.

[0012]

For preparation of the medium, for example, a medium with depletion of glucose as carbohydrate and glutamine from RDF medium (a 2:1:1 mixture of RPMI 1640, DME and Ham's F-12 media), known as a basal synthetic medium, is prepared, and carbohydrate and glutamine are freshly added. Other media such as Dulbecco's MEM (DME), Ham's F-12 and E-RDF (available from Kyokuto Seiyaku Kogyo Inc.) media may be used as basal synthetic media.

[0013]

Any amounts of the carbohydrate and glutamine added to a basal medium as mentioned above may be determined within the available range of their concentration. Preferably, such an amount is 0.5-4.5 g/L for carbohydrate, 0-1,000 mg/L for glutamine.

[0014]

A medium used in the present invention may be either serum-free medium that is not supplemented with serum, or serum medium. As a serum medium, for example, a medium supplemented with 10% fetal bovine serum is used. However, for preparation of monoclonal antibodies, a serum-free medium is desirable because of easiness of antibody purification and cheapness. Additives for a serum-free medium include serum albumin, insulin, transferin, ethanolamine and sodium selenite.

BEST AVAILABLE COPY

01/27/2006 17:05 FAX 2062330644

AMGEN

014

MicroPatent Worldwide PatSearch - JP06292592

<http://www.micropatent.com/cgi-bin/patentlist>

English abstract of Cited Document 1



Include in patent order

MicroPatent^(R) Worldwide PatSearch: Record 1 of 1

[no drawing available]

[Family Lookup](#)

JP06292592

PRODUCTION OF GLYCOPROTEIN
SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

Inventor(s): TACHIBANA HIROFUMI; MURAKAMI HIRONORI; NIIMOTO YOJI; DOSEMARI SHUNICHI

Application No. 08031019, Filed 19940202, Published 19941021

Abstract:

PURPOSE: To alter the kind and molecular weight of bounded sugar chain by changing the sugar composition and/or sugar concentration in a medium for the culture of animal cell to produce a glycoprotein.

CONSTITUTION: The composition and/or concentration of a sugar such as ribose, galactose and glucosamine in a medium are changed in the culture of an animal cell in the medium to produce a glycoprotein. The kind or the molecular weight of the sugar chain of the glycoprotein can be altered by this process to obtain glycoproteins having different activity or stability.

Int'l Class: C12P02100 C12P02108 C12P02100 C12R00191 C12P02108 C12R00191

Priority: JP 05 44587 19930209

MicroPatent Reference Number: 002225034

COPYRIGHT: (C) 1994 JPO



For further information, please contact:
[Technical Support](#) | [Billing](#) | [Sales](#) | [General Information](#)